

# 拮抗微生物の土壤病害抑制機構に関する研究

## 第3報 強拮抗性放線菌によるキャベツ萎黄病菌の形態異常

孫工弥寿雄<sup>1)</sup>・野村 良邦

(野菜・茶葉試験場久留米支場)

### Mechanism of control of soil-borne diseases by antibiotic-producing microorganisms 3. Abnormalities of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* associated with strong antagonistic actinomycetes.

Yasuo SONKU and Yoshikuni NOMURA (Kurume Branch, National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Kurume, Fukuoka 830)

既報において筆者等は、キチン質有機物を長期連用したキャベツ萎黄病の発病土から、拮抗性の放線菌株を分離し、その菌株群は病土中の病原菌に対して特異的に高い抗菌活性を持つ菌株群であることを報告した<sup>1)</sup>。今回は分離した拮抗菌の発病防止機構解明のため、強拮抗性の放線菌株を用い *Fusarium* 属菌等に対する抗菌活性及びキャベツ萎黄病菌菌糸の細胞内容物、形態異常等の観察を行ったので報告する。電顕観察にあたっては佐賀大学田中氏のご協力を得た。厚くお礼申し上げる。

#### 1. キチン質有機物を施用したキャベツ萎黄病土から分離した拮抗性放線菌株群の抗菌活性とその細胞壁タイプ

##### 1) 試験方法

###### (1) 拮抗菌の土壤分離とその抗菌活性の計測及び表示法

分離は発病差が明瞭になった設置後4年と5年目のカニ殻とオキアミ施用キャベツ萎黄病土から常法により、Herr の三層寒天法で行った。検定は1986、'87の両年に分離した1039菌株のうち747菌株についてペーパーディ

スク法で抗菌活性を計測し、下記の拮抗価(仮称)でその強弱を表示した。拮抗価=阻止帯/対峙距離×100。

(2) 分離した拮抗性放線菌株群の細胞壁タイプの同定 検定は中から高拮抗価(15.1~45)を示した241菌株について実施した。菌体加水分解物を薄層クロマト板で展

第1表 キチン質有機物施用キャベツ萎黄病土から2年間に分離された拮抗性放線菌株群の拮抗価分布

拮抗価 階級	合計		1986年		1987年	
	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%
0 ~	150	20.1	104	23.1	46	15.5
0.1~ 5	185	24.8	125	27.8	60	20.2
5.1~10	49	6.6	12	2.7	37	12.5
10.1~15	88	11.1	35	7.8	53	17.8
15.1~20	115	15.4	61	13.6	54	18.2
20.1~25	128	17.1	89	19.8	39	13.1
25.1~30	25	3.3	19	4.2	6	2.0
30.1~35	5	0.7	4	0.9	1	0.3
35.1~40	1	0.1	1	0.2	0	0
40.1~45	1	0.1	0	0	1	0.3
45.1~50	0	0	0	0	0	0
合計	747		450		297	

第2表 高拮抗価放線菌株群の細胞壁タイプ

拮抗価の階級	検定菌株						比較菌株
	45~40	39~35	34~30	29~25	24~20	19~15	
該当数	1	1	5	25	118	91	1
細胞壁タイプ	I	I	I	I	I	I	IV

注) 検定法: LL-ジアミノピメリン酸の同定による(菌体加水分解物—薄層クロマト)

1) 現在 (株)生科研

開し、プレート上のLL-ジアミノピメリン酸の標準品と*Nocardia* sp.の菌体加水分解物との比較で菌体の細胞壁タイプを判定した。

## 2) 試験結果及び考察

(1) 病土から分離した拮抗性放線菌株群の抗菌活性  
計測した747菌株の拮抗価についてその分布比を示すと第1表の通りである。この表によると最も多く分離されたグループは0.1~5(185菌株:24.8%)で、続いて20.1~25(128菌株:17.1%), 15.1~20(115菌株:15.4%), 10.1~15(88菌株:11.1%), 5.1~10(49菌株:6.6%), 25.1~30(25菌株:3.3%), 30.1~35(5.0:7%), 35.1~40(1菌株:0.1%), 40.1~45(1菌株:0.1%)の順に少なくなった。なお、分離時に阻止帯のあった菌株のうち、検定後に0と判定された菌株は、全体の20.1%(150菌株)に達し、拮抗価の低い0.1~5までの

グループと合わせると44.9%(335菌株)であり、このグループの果たす役割は今後解明されなければならない。以上の結果、高度の拮抗価を持つ菌株群(25.1~45)は4.2%, 中度の菌株群(10.1~25)は43.6%, 低度の菌株群(0.1~10)は31.4%となった。又、最高の拮抗価は42.1であり、30.1以上の拮抗価を持つ高拮抗性放線菌株数は7(0.9%)にすぎなかった。(第1表)

## (2) 分離した拮抗性放線菌株の細胞壁タイプ

検定した241菌株の細胞壁タイプは、第2表に示したように全てI型に属し、全てが*Streptomyces*属と判定された。

## 2. 分離された拮抗性放線菌による土壤伝染性病原菌の菌糸伸長阻止作用及び菌糸内容物、形態異状の観察



第1図 強拮抗性放線菌株によるキャベツ萎黄病菌菌糸の内容物及び形態異状の観察

I-A : 位相差顕微鏡による細胞内容物の異常観察(1~4)

I-B : 倒立顕微鏡による菌糸の形態異常の観察(1~6)

II-1~6 : 走査電顕像による菌糸の形態異常の観察

III-1~3 : 走査電顕像による菌糸の溶菌部観察

III-4 : 同上菌糸表面変色衰弱の観察

## 1) 試験方法

## (1) 菌糸伸長阻止作用

供試した拮抗菌はKA856の他5種であり、又、供試した病原菌は、第3表に示した *F. oxysporum* の分化型14種と *Fusarium* 属以外の数種であり、いずれも計測法は前述の抗菌活性の計測法と同じペーパーディスク法により拮抗価を計測した。

## (2) キャベツ萎黄病菌の菌糸の内容物及び形態異状の観察

観察法は Czapeck 平板培地上で拮抗菌と対峙した萎黄病菌の菌そう先端を切り取り、位相差顕微鏡と走査型電子顕微鏡により行った。

## 2) 結果及び考察

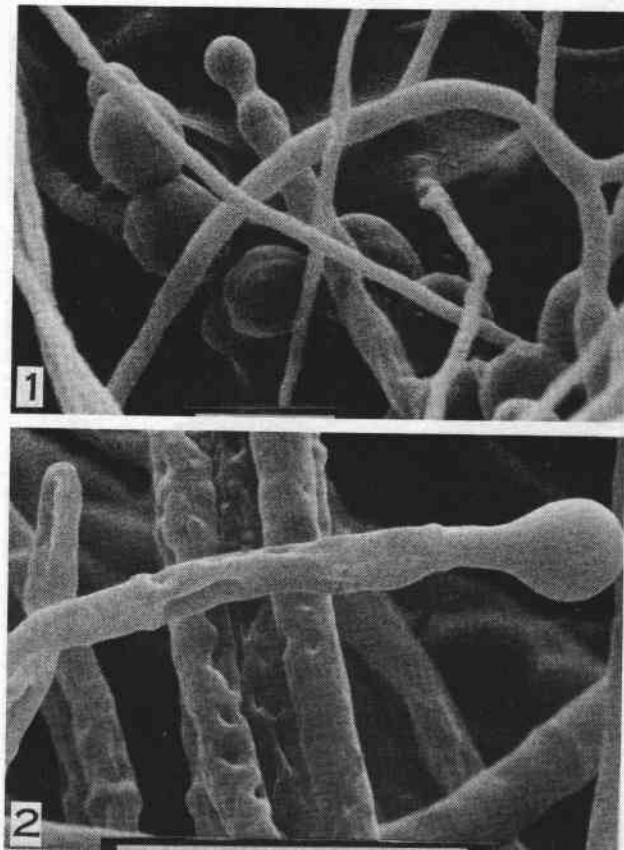
## (1) 菌糸伸長阻止作用

萎黄病の病土から分離した拮抗性放線菌株は、第3表

に示したとおり *F. oxysporum* の全ての分化型に抗菌活性を示した。すなわち、分化型14種に対する拮抗価は平均24.8 (12.4~32.5) で、各分化型別に見るとキャベツ萎黄病菌とイチゴ萎黄病菌に対する抗菌活性が最強で、ダイコン萎黄病菌に対する活性が最弱であった。比較した他の病原菌に対しては、ナス白絹病菌に強い抗菌活性を認めた。

## (2) 拮抗性放線菌による病原菌菌糸の内容物及び形態異常

拮抗菌と対峙培養したキャベツ萎黄病菌菌糸には細胞内容物や形態に異状が観察された。細胞内容物の位相差顕微鏡による観察結果を第1図：I-A (1-4) に示したが、(1)では菌糸先端が溶菌のため細長く収縮黒化し、細胞内容物が凝固している。(2)の菌糸 S 部は細胞内容物が消失空洞化し、(3), (4)は菌糸先端部と基部細胞内容物



第2図 強拮抗性放線菌によるキャベツ萎黄病菌菌糸の形態異常の観察

1. 厚膜胞子化およびらせん化異常
2. 先端円形膨張および菌体膜表面異状

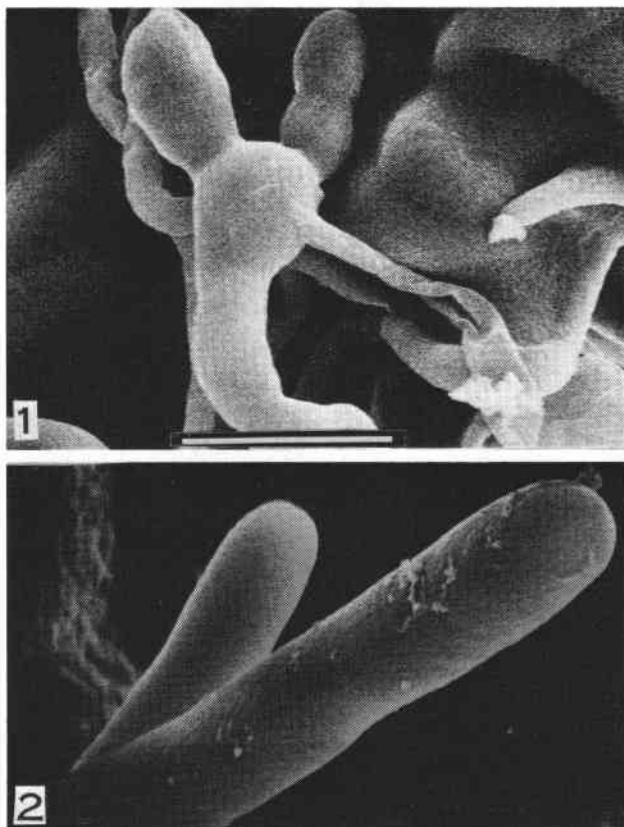
が凝固を示している。一般に拮抗性放線菌の抗菌作用を受けた菌糸が死に至る経過では、表皮変色、細胞内容物の凝固、漏出、空洞化、死滅の経過が観察された。一方、菌糸の形態異状では、第1図—I—B(1—6)のような6種類程度の型があり、(1)先端破裂、(2)先端部細長曲折、(3)先端円形膨張、(4)嵴足、(5)らせん、(6)厚膜胞子化等である。電顕観察でも同様な形態異状が第1図—I—(1—6)で、又、菌糸の溶菌部分が第1図—I—III—(1—3)、菌糸先端部黒変衰弱曲折部分が第1図—I—III—(4)で観察された。又、第2図1、2に厚膜胞子化またはらせん化異常、先端円形膨脹および菌体膜表面異常の電顕像拡大写真を、又、第3図に嵴足化又は溶菌破裂および健全菌糸の拡大写真を示した。

キチン含量が10~40%に達するカニ殻やオキアミを、土中に施用すると細菌や放線菌が著しく増殖する<sup>2)</sup>。こ

れらの菌群の内、ある物は、キチナーゼを分泌して細胞壁にキチン質をもつ、例えは*F. solani* のような病原菌の菌体膜をも溶解する<sup>3)</sup>。これらの菌体膜組成のうち、キチン又はキトサン含量の多い糸状菌に対する溶菌については、近年多くの研究報告がみられ、これらの報告は筆者等が観察したキャベツ萎黄病菌の形態異状を裏づけるものである。しかし、拮抗性の放線菌による*Fusarium*属の病原菌菌体膜の形態異状や細胞内容物の異状を観察した報告はない。今後、病原菌の拮抗微生物による防除機構解明の手段として、更にその死滅に至る過程の形態や細胞内容物の変化についての解明が望まれる。

## 要 摘

1) キチン質有機物のカニ殻とオキアミを施用した4年目と5年目のキャベツ萎黄病病土から分離した747菌



第3図 強拮抗性放線菌株によるキャベツ萎黄病菌菌糸の形態異常の観察

1. 嶴足化および溶菌破裂
2. 健全菌糸および菌糸先端部

第3表 拮抗性放線菌の *Fusarium oxysporum* 菌群に対する抗菌活性

(拮抗菌株: KA 856)

病 原 菌	拮抗価
イチゴ萎黄病菌	32.5
キャベツ萎黄病菌	31.8
カーネーション萎ちよう病菌	30.9
スイカつる割病菌	30.6
ヘチマつる割病菌	26.7
メロンつる割病菌	26.2
トマト萎ちよう病菌 (J <sub>1</sub> )	25.0
アスピラガス立枯病菌	23.2
ホウレンソウ萎ちよう病菌	22.2
シュンギク萎ちよう病菌	22.2
トマト萎ちよう病菌 (J <sub>2</sub> )	21.4
ユウガオつる割病菌	21.3
キュウリつる割病菌	20.9
ダイコン萎黄病菌	12.4
平均	24.8
そ の 他 菌 群	
ナス白絹病菌	66.3
ナス立枯病菌	26.4
トマト疫病菌	21.5
平均	38.1

株について、その抗菌活性を計測した結果、高拮抗価を持つ菌株群は4.2%，中度の菌株群は43.6%，低度の菌株群は31.4%で、30.1以上の拮抗価を持つ高拮抗性放線菌株は0.9%にすぎなかった。

2) 分離した241菌株の拮抗性放線菌株の細胞壁タイプを同定した結果、全てI型で *Streptomyces* 属と判明した。

3) 分離した拮抗性放線菌は、*F. oxysporum*の14種分化型全てに対して拮抗性があり、又、ナス白絹病菌に対しても強い拮抗性が認められた。

4) 拮抗性放線菌によるキャベツ萎黄病菌の細胞内容物や形態異常の観察を位相差、又は、走査型電子顕微鏡で行った結果、細胞内容物には、異常な顆粒状化、凝固、内容物消失、空洞化が見られた。菌糸が死滅に至る過程では、細胞内容物凝固、漏出、空洞化、死滅の経過が観察された。又、菌糸の形態異常では6種類程度の異常型が見られた。

#### 引 用 文 献

- 孫工弥寿雄・野村良邦 (1987) 日植病報 53(3): 414.
- 孫工弥寿雄・野村良邦 (1988) 日植病報 54(1): 83.
- VAN ECK, W. H. (1987) Soil Biol. Biochem., 10: 89-92.

(1988年5月19日 受領)